

RESEARCH

PRODUCTS

INSIDE DELPHION

[Log Out](#) [WorkFiles](#) [Saved Searches](#)
[My Account](#) | [Products](#)
[Search:](#) Quick/Number Boolean Advanced Derwent
[Help](#)

The Delphion Integrated View

Buy Now: PDF | [More choices...](#)Tools: Add to Work File: Create new Work File [Go!](#)View: [INPADOC](#) | Jump to: [Top](#)
 Go to: [Derwent](#)
 Email this to a friend
Title: **JP9234064A2: N-ACETYLGLUCOSAMINE 6-PHOSPHATE DEACETYLASE**

Derwent Title: N-Acetylglucosamine-6-phosphate deacetylase - produced by culturing psychrophilic bacterium of vibrio genus
[\[Derwent Record\]](#)

Country: JP Japan

Kind: A (See also: [JP2824508B2](#))

Inventor: FUJISHIMA SHIZUKA;
 YAMANO NAOKO;
 MARUYAMA AKIHIKO;
 HIGASHIHARA TAKANORI;

Assignee: AGENCY OF IND SCIENCE & TECHNOL
[News, Profiles, Stocks and More about this company](#)

Published / Filed:
 1997-09-09 / 1996-03-04

Application Number: [JP1996000075250](#)IPC Code: [C12N 9/80; C12N 9/80;](#)Priority Number: 1996-03-04 [JP1996000075250](#)

Abstract: PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain the subject new deacetylase capable of deacetylating N- acetyl-D-glucosamine 6-phosphate and producing D-glucosamine 6-phosphate useful as a substrate in the field of biochemistry and medical sciences.

SOLUTION: This enzyme which is important in the field of biotechnology and obtained by cultivation of a marine cold bacterium strain Vibro sp, P2K-5 (FERM P-15480), is N-acetylglucosamine 6-phosphate deacetylase having the following properties: (1) acting on the acetamide groups of N-acetylglucosamine 6-phosphate to produce glucosamine 6-phosphate.; (2) having the optimum pH at 8.0 to 9.0; (3) having the optimum action temperature at 40 to 42°C. This enzyme has high activity, retains the high activity even at ≥40°C and can be made to act under conditions without any cooling device.

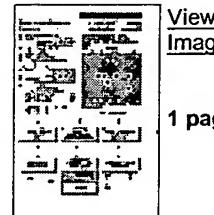
COPYRIGHT: (C)1997,JPO

INPADOC Legal Status: None Buy Now: [Family Legal Status Report](#)

Family:

Buy PDF	Publication	Pub. Date	Filed	Title
<input type="checkbox"/>	US5744325	1998-04-28	1997-02-26	Process for producing N-acetylglucosamine-6-phosphate deacetylase
<input checked="" type="checkbox"/>	JP9234064A2	1997-09-09	1996-03-04	N-ACETYLGLUCOSAMINE 6-PHOSPHATE DEACETYLASE
<input checked="" type="checkbox"/>	JP2824508B2	1998-11-11	1996-03-04	NNASECHIRUGURUKOSAMIN66RINSANDEASECHIRAAZE

3 family members shown above


[View Image](#)
 1 page

Other Abstract Info: CHEMABS 127(15)202078H CAN127(15)202078H DERABS C97-497307 DERC97-497307

225015

Subject: Web Document Delivery Request

From: info@biotechresources.com

Date: Wed, 25 Feb 2004 14:09:56 -0600

To: wts@engr.wisc.edu

Company: Bio-Technical Resources
Division:
Attn: Tina DeLong - 2 - 25- 04 - PATENT - 9
Address: 1035 S. 7th Street
(line 2):
City, State, Zip: Manitowoc, WI 54220
Phone: 920-684-5518
Fax: 920-684-5519

P.O./Reference#

FEB 27 2004

Shipping Instructions: 1st Class (standard)

Special Shipping Instructions:

MAIL

Email: info@biotechresources.com

Need by (date/time):

Rush:

Super Rush:

Copyright royalty fee: no

Refer?: Refer outside UW-Madison

Request is:

Fujishima et al

N-acetylglucosamine 6-phosphate dacetylase

1996

JP9234064A2

Request complies with: ccg: ccl: yes

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平9-234064

(43)公開日 平成9年(1997)9月9日

(51)Int.Cl.
C 12 N 9/80
// C 12 N 9/80
C 12 R 1:63)

識別記号 庁内整理番号

F I
C 12 N 9/80

技術表示箇所
Z

審査請求 有 請求項の数15 FD (全 5 頁)

(21)出願番号 特願平8-75250
(22)出願日 平成8年(1996)3月4日

(71)出願人 000001144
工業技術院長
東京都千代田区霞が関1丁目3番1号
(72)発明者 藤嶋 静
大阪府池田市緑丘1丁目8番31号 工業技術院大阪工業技術研究所内
(72)発明者 山野 尚子
大阪府池田市緑丘1丁目8番31号 工業技術院大阪工業技術研究所内
(72)発明者 丸山 明彦
茨城県つくば市東1丁目1番3 工業技術院生命工学工業技術研究所内
(74)指定代理人 工業技術院大阪工業技術研究所長
最終頁に続く

(54)【発明の名称】 N-アセチルグルコサミン6-リン酸デアセチラーゼ

(57)【要約】

【課題】40°C以上の高温で高活性を有するN-アセチルグルコサミン6-リン酸デアセチラーゼを提供する。また、該酵素を加温の必要なく、室温で効率的に生産する技術を提供する。

【解決手段】低温細菌ビブリオ (Vibrio) 属に属し、N-アセチルグルコサミン6-リン酸のアセトアミド基に作用するデアセチラーゼ生産菌を培養し、その培養物からN-アセチルグルコサミン6-リン酸デアセチラーゼを採取することを特徴とする、N-アセチルグルコサミン6-リン酸デアセチラーゼの製造方法；N-アセチルグルコサミン6-リン酸デアセチラーゼ；並びに低温細菌ビブリオ (Vibrio) 属に属する細菌。

【特許請求の範囲】

【請求項1】低温細菌ビブリオ (*Vibrio*) 属に属し、N-アセチルグルコサミン6-リン酸のアセトアミド基に作用するデアセチラーゼ生産菌を培養し、その培養物からN-アセチルグルコサミン6-リン酸デアセチラーゼを採取することを特徴とする、N-アセチルグルコサミン6-リン酸デアセチラーゼの製造方法。

【請求項2】前記微生物が海洋低温細菌ビブリオ属細菌P2K-5菌株 (*Vibrio* sp. P2K-5菌株, FERM P-15480) である請求項1記載のN-アセチルグルコサミン6-リン酸デアセチラーゼの製造方法。

【請求項3】前記N-アセチルグルコサミン6-リン酸デアセチラーゼが、5°Cから60°Cの範囲で活性を有する請求項1または2記載のN-アセチルグルコサミン6-リン酸デアセチラーゼの製造方法。

【請求項4】前記N-アセチルグルコサミン6-リン酸デアセチラーゼの至適温度が40-42°Cである請求項1~3のいずれかに記載のN-アセチルグルコサミン6-リン酸デアセチラーゼの製造方法。

【請求項5】前記N-アセチルグルコサミン6-リン酸デアセチラーゼが30°Cまでの温度でpH8.5、30分間インキュベート後、100%の活性を保持するN-アセチルグルコサミン6-リン酸デアセチラーゼの製造方法。

【請求項6】前記N-アセチルグルコサミン6-リン酸デアセチラーゼが40°Cまでの温度でpH8.5、30分間インキュベート後、60%以上の活性を保持するN-アセチルグルコサミン6-リン酸デアセチラーゼの製造方法。

【請求項7】請求項1~6のいずれかの方法により得ることができるN-アセチルグルコサミン6-リン酸デアセチラーゼ。

【請求項8】5°Cから60°Cの範囲で活性を有するN-アセチルグルコサミン6-リン酸デアセチラーゼ。

【請求項9】至適温度が40-42°CであるN-アセチルグルコサミン6-リン酸デアセチラーゼ。

【請求項10】30°Cまでの温度でpH8.5、30分間インキュベート後、100%の活性を保持するN-アセチルグルコサミン6-リン酸デアセチラーゼ。

【請求項11】40°Cまでの温度でpH8.5、30分間インキュベート後、60%以上の活性を保持するN-アセチルグルコサミン6-リン酸デアセチラーゼ。

【請求項12】N-アセチルグルコサミン6-リン酸デアセチラーゼの生産能を有する低温細菌ビブリオ属に属する細菌。

【請求項13】前記細菌がP2K-5菌株 (*Vibrio* sp. P2K-5菌株, FERM P-15480) である請求項12に記載の細菌。

【請求項14】低温細菌ビブリオ属に属するN-アセチルグルコサミン6-リン酸デアセチラーゼ生産菌。

【請求項15】前記細菌がP2K-5菌株 (*Vibrio* sp. P2K-5菌株, FERM P-15480) である請求項14に記載の生産菌。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、N-アセチルグルコサミン6-リン酸デアセチラーゼの製造方法に関するものである。本発明による酵素、N-アセチルグルコサミン6-リン酸デアセチラーゼは、バイオテクノロジーの分野で重要であり、本酵素によって生産されるD-グルコサミン6-リン酸は、基質として生化学、医学の分野で有用な物質である。

【0002】

【従来の技術】N-アセチルグルコサミン6-リン酸デアセチラーゼは、N-アセチルグルコサミン6-リン酸のアセトアミド基に作用して、D-グルコサミン6-リン酸を生成する酵素である。従来、大腸菌による該酵素の生産が知られているが、その活性は低く、工業的に利用できるものではない。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、バイオテクノロジー分野での使用に供することができる、タンパク質として均一かつ安定なN-アセチルグルコサミン6-リン酸デアセチラーゼを提供するとともに、該酵素を工業的に製造できる方法を提供することを目的とする。

【0004】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、海洋性低温細菌ビブリオ (*Vibrio*) 属について研究を重ねた結果、該微生物がN-アセチル-D-グルコサミン6-リン酸を脱アセチルする酵素を生産する事を見い出し、本発明を完成した。

【0005】すなわち、本発明は、低温細菌ビブリオ (*Vibrio*) 属に属する菌株をN-アセチルグルコサミン6-リン酸デアセチラーゼ誘導用培地で培養し、N-アセチルグルコサミン6-リン酸デアセチラーゼを生成蓄積せしめ、次いで該酵素を単離することを特徴とするN-アセチルグルコサミン6-リン酸デアセチラーゼの製造方法に関する。また、本発明は、N-アセチルグルコサミン6-リン酸デアセチラーゼ及びその生産菌にも関する。

【0006】

【発明の実施の形態】本発明に用いられる微生物は、低温細菌ビブリオ属に属し、該N-アセチルグルコサミン6-リン酸デアセチラーゼの生産能を有するものであれば、いずれも使用することができる。例えば、本発明者らが日本海溝の深層水から分離した海洋低温細菌P2K-5菌株 (FERM P-15480) を例示することができる。

【0007】N-アセチルグルコサミン6-リン酸デアセチラーゼ生産性海洋低温細菌P2K-5菌株 (FERM P-15480) の菌学的性質は、下記の通りである。

【0008】1. 形態的性質

(1) 細胞形態：桿状 (rod)

(2) 鞭毛形態：極べん毛

(3) グラム染色：陰性

2. 生理的性質

(1) 増殖温度

4°C: +

25°C: +

30°C: +

(2) O-Fテスト: Fermentative

(3) 塩類要求性: +

(4) 色素生産: -

(5) オキシダーゼ: +

(6) カタラーゼ: +

3. 分離源：日本海溝の水深6000mの海水

上記菌学的性質の試験方法は、主として絵面良男：沿岸環境調査マニュアルII〔水質・微生物篇〕、日本海洋学会編、恒星社厚生閣、p.357-364(1990)に従った。また、駒形和男：微生物の分類と同定(下)、(改訂版、長谷川武治編著)、学会出版センター、p.99-161(1985)を参考にした。

【0009】以上の菌学的性質を、絵面と清水の海洋細菌の簡易同定図式(沿岸環境調査マニュアルII〔水質・微生物篇〕、日本海洋学会編、恒星社厚生閣、p.357-364(1990))に基づき、Bergery's Manual of Systematic Bacteriology, vol.1(N.R.Krieg, J.G.Holt編、Williams & Wilkins, Baltimore, 1984)及びBergery's Manual of Determinative Bacteriology(第9版、J.G.Holt, N.R.Krieg, P.H.A.Sneath, J.T.Staley, S.T.Williams編、Williams & Wilkins, Baltimore, 1984)を参考にして対比した結果、本海洋低温細菌P2K-5菌株(FERM P-15480)は、低温細菌ビブリオ(Vibrio)属に属する細菌と同定された。

【0010】この海洋低温細菌P2K-5菌株(FERM P-15480)を用いて、N-アセチルグルコサミン6-リン酸デアセチラーゼを生産するには、当該菌体を適当な培地に接種し、好ましくは誘導物質の存在下で常法に従って培養すればよい。この誘導物質としては、キチン、キチン分解物、N-アセチルグルコサミン6-リン酸、N-アセチルグルコサミン、N-アセチルグルコサミンオリゴマーを単独又はこれらのうち2種以上を組み合わせたものを使用できる。好ましい誘導物質は、N-アセチルグルコサミン、N-アセチルグルコサミンオリゴマーが挙げられ、最も好ましい誘導物質は、N-アセチルグルコサミンである。誘導物質は、0.1g/リトル以上、好ましくは1.0~50g/リトルの濃度で加える。培地は格別である必要はなく、通常の培地が用いられる。例えば、炭素源としてグルコース、マルトース、キシロース、スクロース、ペプトン等が例示でき、窒素源としては、イーストエキス、ペプトン、肉エキス、アミノ酸溶液等の有機窒

素、または硫酸アンモニウム、塩化アンモニウム等の無機窒素が例示できる。また誘導物質を炭素源、窒素源としてもよい。無機塩としては、硫酸マグネシウム、塩化マグネシウム、リン酸ナトリウム、リン酸カリウム、塩化カリウム、塩化ナトリウム、塩化カルシウム等を適宜組み合わせて使用できる。上記培地のpHは、適當な酸または塩基を加えることにより、6.5から8.5の範囲内に調整され、オートクレーブにより殺菌される。培養温度は、4~35°C、好ましくは15から28°Cで20~48時間好気的に振とうまたは搅拌しながら培養を行う。また上記の炭素源、窒素源、無機塩、及び寒天を適宜含む平板培地を使用し、培養温度4~35°C、好ましくは15から28°Cで20~72時間培養を行う。また、本菌の培養は、静置でも行われる。

【0011】培養によって得られた培養物から培養液と菌体とを分離する方法としては、従来から行われている遠心分離法やろ過等の方法が使用できるが、遠心分離法が好適である。菌体内に蓄積された該酵素を菌体から抽出する方法としては、従来から行われている超音波による菌体破碎、あるいはガラス・ビーズと共に回転させるダイノミル細胞破碎機による菌体破碎、またはリゾチーム等の酵素やトルエン等の有機溶媒による細胞膜の破壊等の方法が挙げられる。これらの中から適當な方法を選択して菌体から酵素の抽出を行うことにより、酵素を採取することができる。

【0012】これらの方法で抽出された粗酵素液からN-アセチルグルコサミン6-リン酸デアセチラーゼをさらに精製する必要がある場合には、通常実施されている一般的な酵素の精製手段である硫酸アンモニウム沈澱法、イオン交換クロマトグラフィー、ゲルろ過法、吸着クロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー、ハイドロフォービック・クロマトグラフィー、調製用電気泳動法等を適宜組み合わせることによって、精製を行うことができる。

【0013】本発明により得られたN-アセチルグルコサミン6-リン酸デアセチラーゼは、以下の理化学的性質を有する。

【0014】(1) 作用: N-アセチルグルコサミン6-リン酸のアセトアミド基に作用し、グルコサミン6-リン酸を生成する。

【0015】(2) 至適pH: 8.0~9.0(図1に示される。)

(3) 安定pH: 8.0~10(20°C、30分間インキュベート後、90%以上の活性が保持される。)

(4) 至適温度: 40~42°C(図2に示される。)

(5) 熱安定性: pH8.5、30分間インキュベート後、30°Cまで100%の活性を保持。同じく40°Cまでは、60%以上の活性が保持される。

【0016】なお活性は、以下の方法により測定した。

【0017】75mMリン酸緩衝液(pH8.5)0.3mlに基質と

して1%N-アセチルグルコサミン6-リン酸溶液0.1mlを加え、さらに酵素液0.1mlを加え、40°Cで30分間インキュベートする。その後、生成したD-グルコサミン6-リン酸をインドール・塩酸法で比色定量する。

【0018】なお、酵素の1単位(ユニット)は、1分間に1μmolのアミノ糖を生成する酵素量を表す。

【0019】

【発明の効果】本発明による酵素N-アセチルグルコサミン6-リン酸デアセチラーゼは、バイオテクノロジーの分野で重要であり、本酵素によって生産されるD-グルコサミン6-リン酸は、基質として生化学、医学の分野で有用な物質である。

【0020】本発明によるN-アセチルグルコサミン6-リン酸デアセチラーゼは、9.65units/mg-protein(30°Cでの活性)、14.5units/mg-protein(40°Cでの活性)、50°Cにおいても7.5units/mg-proteinの活性を有する。本発明に係るN-アセチルグルコサミン6-リン酸デアセチラーゼは、極めて高い活性を有するだけでなく、40°C以上でも高い活性を保持し、使用に際し冷却装置を必要としない利点を持つ。さらに、本発明は、N-アセチルグルコサミン6-リン酸デアセチラーゼを工業的に、かつ通常加温することなく室温にて、従って低コストで製造する技術をも提供するものである。

【0021】以下、実施例により本発明をさらに詳細に説明する。

【0022】

【実施例】

実施例1：3gのアガーを含む市販のBHI(商品名、DIFO製)平板培地に、低温細菌ビブリオ(Vibrios p. P2K-5、FERM P-15480)を接種し、20°Cで36時間培養した。その後、滅菌スパチュラを用いて集めた菌体を、以下の液体培地に接種し、混和後、20°Cで36時間、好気的に振とう培養した。

【0023】培地：800ml当たり、2.4gの硝酸アンモニウム、0.8gのリン酸水素二カリウム、8gの塩化ナトリウム、0.4gの硫酸マグネシウム、0.8gの塩化カルシウム、当該酵素の誘導物質のN-アセチルグルコサミン40gを含む。

【0024】(1) 精製工程1

その後、培養液を8000×gで20分間遠心分離にかけ湿重量21gの菌体を得た。得られた菌体は、40mlの生理食塩水にけん渦し、0°Cで10分間超音波処理(20秒間作動、20秒間休止)を行った後、12000×gで1時間遠心分離を行い、上清液を得た。この上清液中には、N-アセチルグルコサミン6-リン酸に対し総活性150units、比活性0.188units/mg-proteinの酵素が含有された。

【0025】(2) 精製工程2

精製工程1で得られたこの上清液を、予め10mMのリン酸緩衝液(pH7.0)で平衡化した30mlのDEAE Bio-Gel A(商品名、Bio-Rad製)カラムに通し、目的とする酵素

を吸着させた。カラムを同様のリン酸緩衝液で洗浄した後、段階的に塩化ナトリウムの濃度を変化させて目的酵素を溶出し、N-アセチルグルコサミン6-リン酸に対し総活性102units、比活性0.657units/mg-proteinを有する酵素画分を得た。

【0026】(3) 精製工程3

さらに上記の活性画分を、予め10mMのリン酸緩衝液(pH7.0)で平衡化した10mMのハイドロキシアバタイト(商品名、東亜合成化学製)カラムに通し、目的とする酵素を吸着させた。カラムを同様のリン酸緩衝液で洗浄した後、段階的にリン酸緩衝液の濃度を変化させて目的酵素を溶出し、N-アセチルグルコサミン6-リン酸に対し総活性21.2ユニット、比活性2.30units/mg-proteinを有する酵素標品を得た。

【0027】(4) 精製工程4

次いで、上記の活性画分を、予め100mMのリン酸2水素カリウム溶液で平衡化したHiTrapTM Q(商品名、ファルマシア製)カラムに通し、目的とする酵素を吸着させた。カラムを同様のリン酸2水素カリウム溶液で洗浄した後、段階的に塩化ナトリウム濃度を変化させて目的酵素を溶出し、N-アセチルグルコサミン6-リン酸に対し総活性10.4units、比活性1.61units/mg-proteinを有する酵素標品を得た。

【0028】(5) 精製工程5

さらに上記の活性画分を、予め10mMのリン酸緩衝液(pH7.0)で平衡化した2mlのQAE Sephadex A-50(商品名、ファルマシア製)カラムに通し、目的とする酵素を吸着させた。カラムを同様のリン酸緩衝液で洗浄した後、段階的に塩化ナトリウム濃度を変化させて目的酵素を溶出し、N-アセチルグルコサミン6-リン酸に対し総活性3.58units、比活性9.65units/mg-proteinを有する酵素標品を得た。

【0029】この酵素標品をSDSポリアクリルアミド電気泳動によって測定した結果、1本のバンドが得られ、タンパクとして均一であることを確認した。

【0030】また、該酵素はN-アセチルガラクトサミンには全く作用しなかった。

【0031】実施例2

上記実施例1の精製工程1～3で得られた各精製段階の酵素のN-アセチルグルコサミンに対するデアセチラーゼ作用の総活性及び比活性を測定した。結果を表1に示す。

【0032】

【表1】

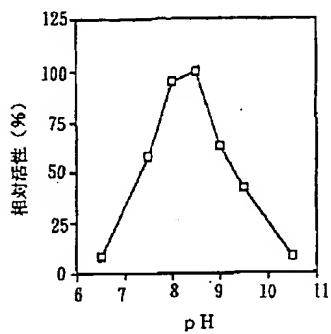
酵素	総活性 (units)	比活性 (units/mg-protein)
精製工程1	75	0.094
精製工程2	50	0.313
精製工程3	12	0.92

上記のように、本願発明の酵素は、N-アセチルグルコ

サミンに対してもデアセチラーゼ作用を有するが、その作用は、N-アセチルグルコサミン6-リン酸を基質とした場合よりも、弱いものであった。

【図面の簡単な説明】

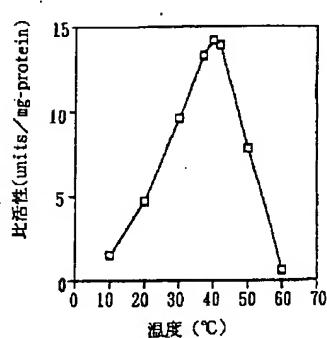
【図1】



【図1】ビブリオ (Vibrio SP. P2K-5, FERM P-1548 0) 由来デアセチラーゼのN-アセチルグルコサミン6-リン酸に対する活性の至適pH曲線を示す。

【図2】同酵素の温度活性曲線を示す。

【図2】



フロントページの続き

(72)発明者 東原 孝規
茨城県つくば市東1丁目1番3 工業技術
院生命工学工業技術研究所内